
Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen oder von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen

5

Adulte neuronale Stammzellen wurden bereits aus verschiedenen Regionen des Gehirns isoliert (zur Übersicht siehe (Gage FH, 2000, Science, 287, 1433-1438; Ostenfeld T and Svendsen CN, 2003, Adv Tech Stand Neurosurg, 28, 3-89)), unter anderem auch dem Hippocampus des Säugergehirns (Eriksson PS et al., 1998, Nat Med, 4, 1313-1317; Gage FH et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 11879-11883; Johansson CB et al., 1999, Exp Cell Res, 253, 733-736). Diese Zellen besitzen, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, nicht mehr das Potenzial, zu allen Zelltypen des Körpers zu differenzieren (Totipotenz), sie können jedoch zu den verschiedenen im Gehirn vorkommenden Zelltypen differenzieren (Pluripotenz). Dabei erfahren sie wesentliche morphologische und funktionelle Veränderungen (van Praag H et al., 2002, Nature, 415, 1030-1034).

Durch die Verwendung von neuronalen Stammzellen können ethische Probleme, wie sie bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen in der Medizin bzw. der Biotechnologie auftreten, umgangen werden (Heinemann T and Honnefelder L, 2002, Bioethics, 16, 530-543).

Andere Methoden der Differenzierung und selektiven Anreicherung neuronaler Zellen enthalten kompliziertere Differenzierungsprotokolle (Björklund A and Lindvall O, 2000, Nat Neurosci, 3, 537-544; Björklund A and Lindvall O, 2000, Nature, 405, 892-893, 895.; Cameron HA et al., 1998, J Neurobiol, 36, 287-306.; McKay R, 2000, Nature, 406, 361-364.). So müssen z.B. beim Fluorescence-Aided Cell Sorting (FACS) die Zellen spezifische Marker exprimieren, damit sie mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert und dann von den unmarkierten Zellen beim Durchlaufen einer Glaskapillare getrennt werden können. Auch können die Zellen durch diese Art der Durchflußzytometrie Schaden nehmen.

BEST AVAILABLE COPY

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Auch führen andere selektiven Zellkulturmedien zu einer geringen Ausbeute an differenzierten Neuronen (Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C, Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. Lab Invest. 2003, 83:949-62. Das Differenzierungsmonitoring ist ebenfalls oftmals schwierig.

Die bisher beschriebenen Methoden zur Stammzelldifferenzierung, bzw. zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen oder von diesen abgeleiteten Zellen, weisen somit mindestens einen oder mehrere der folgenden Nachteile auf:

- die Verfahren sind nicht hochdurchsatz-fähig
- die Verwendung embryonaler Stammzellen bringt große ethische Probleme mit sich
- die Differenzierungsprotokolle sind kompliziert
- die Ausbeute an differenzierten Zellen ist gering
- das Monitoring der Differenzierung ist schwierig

Aufgabe der Erfindung ist es, die wesentlichen Nachteile der bekannten Verfahren zu beseitigen oder zumindest zu minimieren.

Eine Lösung der gestellten Aufgabe ist das Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend a) das in Kontakt bringen der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibiert und b) das Kultivieren dieser Zellen unter Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen, bzw. die von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen.

Einen wichtigen Signalweg für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen stellt der Wnt-Signalweg dar (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226-239.; Peifer M and Polakis P,

2000, Science, 287, 1606-1609, siehe auch Abb. 6). Er ist in der Ontogenese und Embryogenese u. a. für die posteriore Verlagerung der Neuralplatte und die Mittelhirn- und Kleinhirnentwicklung zuständig (Sokol SY, 1999, Curr Opin Genet Dev, 9, 405-410). Außerdem spielt Wnt eine wichtige Rolle in der Spezifizierung neuronaler Zelltypen (Interneurone) (Muroyama Y et al., 2002, Genes Dev, 16, 548-553) und agiert als Faktor für die Selbsterneuerung von Stammzellen (Kato M, 2002, Int J Mol Med, 10, 683-687.; Song X and Xie T, 2002, Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 14813-14818.). In embryonalen Stammzellen führt die Inhibition des Wnt-Signalweges zur neuronalen Differenzierung dieser Zellen (Aubert J et al., 2002, Nat Biotechnol, 20, 1240-1245.). In hämatopoetischen Stammzellen ist der Wnt-Signalweg zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und Proliferation beschrieben (Reya T et al., 2003, Nature, 423, 409-414.; Lako M et al., 2001, Mech Dev, 103, 49-59.; Willert K et al., 2003, Nature, 423, 448-452.)) Über Effekte der Wnt-Wirkung in Stammzellen, die aus dem adulten Gehirn isoliert werden, liegen bislang aber keine Erkenntnisse vor.

Der Wnt-Signalweg umfasst komplex regulierte Signalketten (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226-239.). Durch Bindung eines Wnt-Signalmoleküls an den spezifischen Rezeptor kommt es zu einer Inhibition des Signalvermittlers Dsh (Dishevelled), das wiederum die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) (Woodgett JR, 2001, Sci STKE, 2001, RE12) inhibiert. Diese phosphoryliert in Interaktion mit Axin und APC (Adenomatöses Polyposis Coli Protein) (Kielman MF et al., 2002, Nat Genet, 32, 594-605) den Transkriptionsfaktor beta-Catenin, das in unphosphoryliertem Zustand über den Transkriptionsfaktor Tcf/Lef1 die Transkription im Zellkern beeinflussen kann. Phosphoryliertes beta-Catenin dagegen wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Inhibierung einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges durch eine Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3. Dies kann durch den Inhibitor Genistein geschehen.

Optional kann eine Konzentrationsbestimmung von β -Catenin, einem Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges, und (im phosphorylierten Zustand) Produkt der Glykogen-Synthase-Kinase-3, erfolgen. Die Konzentration kann dann mit der entsprechenden Konzentration des Proteins in einer unbehandelten Vergleichszelle verglichen werden.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung betreffen Zellen, erhältlich nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren, einen neurologischen Gewebeersatz, der diese Zellen aufweist, sowie pharmazeutische Mittel (Medikamente), welche diese Zellen enthalten.

5

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signaltransduktionsweg hemmen und so zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen geeignet sind, sowie Medikamente, die diese Substanzen enthalten.

10

Alle erfindungsgemäßen Medikamente können zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen verwendet werden, welche durch die Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionsweges positiv beeinflusst werden können. Vor allem zählen zu diesen Krankheiten Erkrankungen, bei denen, direkt oder indirekt, Gehirnzellen absterben.

15

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von neuronalen Stammzellen, welche entweder ein Protein exprimieren, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges inhibieren kann, oder welche ein Protein dieses Stoffwechselweges nicht, inaktiv oder vermindert exprimieren, zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen.

20

Weiterhin betrifft die Erfindung Kits zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen.

25

Der Begriff „Differenzierung“ bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung den, im Vergleich mit der Ausgangszelle, zunehmenden Erwerb oder Besitz von einer oder mehreren Charakteristika oder Funktionen.

30

Der Ausdruck „Stammzelle“ charakterisiert eine Zelle, die proliferiert, sich selbst erneuert und die Fähigkeit zur Differenzierung beibehält. Umfasst sind hierbei auch Progenitorzellen. Der Begriff "neuronale Stammzelle" wird für eine aus dem

Zentralnervensystem isolierte Zelle verwendet, die zu Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung unter Hervorbringung von Gehirnzellphänotypen fähig ist. Eine „von neuronalen Stammzellen abgeleitete Zelle“ ist dann eine gehirnzellenähnliche Zelle, die trotzdem noch das Potential zur Differenzierung besitzt, und aus einer (hypothetischen) neuronalen Stammzelle hervorgegangen ist.

Die neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen sind dabei bevorzugt Säugerzellen, wobei der Begriff auch Affen, Schweine, Schafe, Ratten, Mäuse, Kühe, Hunde etc. umfasst. Bevorzugt ist das Säugetier ein Mensch. Die verwendeten Zellen können frisch oder zuvor gefroren worden sein, bzw. einen früheren Kultur entstammen.

Die Zellen werden in einem geeigneten Medium kultiviert. Diverse Medien sind kommerziell erhältlich, einschließlich Neurobasal-Medium, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Ex vivo Serum freies Medium, Iscove's Medium, etc.. Geeignete Antibiotika (z.B. Penicillin und Streptomycin) zur Verhinderung von bakteriellem Wachstum bzw. andere Zusätze wie Heparin, Glutamin, B27, EGF, FGF2 oder fetales Kälberserum können hinzugefügt werden.

Nach dem Animpfen des Mediums werden die Kulturen unter Standardbedingungen, meist bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Frisches Medium kann in geeigneter Weise zugeführt werden, zum Teil durch Entfernen eines Teils des Mediums und Ersatz durch frisches Medium. Verschiedenste handelsübliche Systeme wurden zur Beseitigung von nachteiligen Stoffwechselprodukten bei der Kultivierung von Säugerzellen entwickelt. Durch Einsatz dieser Systeme kann das Medium als kontinuierliches Medium aufrechterhalten werden, so dass die Konzentration diverser Inhaltsstoffe relativ konstant oder innerhalb eines vorgegebenen Bereichs bleibt.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist dem Fachmann bekannt (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226-239.; Peifer M and Polakis P, 2000, Science, 287, 1606-1609, siehe auch Fig. 6). Weitere Reaktionsschritte des Wnt-Signaltransduktionsweges, weitere den Signaltransduktionsweg beeinflussende Rezeptoren bzw. neue, an den bereits bekannten Reaktionsschritten beteiligte Proteine sind ebenfalls als Bestandteil des Wnt-Signaltransduktionsweges im Sinne dieser Erfindung anzusehen.

„Inhibieren“ oder „Inhibition“ ist im Zusammenhang mit der Modulation einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges weit auszulegen, und umfasst die teilweise, im Wesentlichen vollständige oder vollständige, auf unterschiedlichste zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung einer Reaktion des Signaltransduktionsweges. Dabei ist mit statistischer Wahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Reaktion einer unbehandelten Vergleichszelle erkennbar.

Dem Fachmann sind verschiedenste Strategien geläufig, um die genannten Reaktionen in gewünschter Weise zu beeinflussen. Eine erfindungsgemäß bevorzugte Strategie besteht in der Verwendung einer Substanz, welche ein Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges selber inhibiert oder gezielt eine wesentliche Eigenschaft desselben vermindert. Entsprechende Substanzen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise Substrat-Analoga, welche mit dem ursprünglichen Substrat konkurrieren, aber nur geringfügig bzw. nicht umgesetzt werden und so dass jeweilige Enzym blockieren. Weiterhin könnte es sich bei einer solchen Substanz auch um einen Antikörper handeln. Eine andere erfindungsgemäße Vorgehensweise umfasst die Verwendung einer „antisense“-Nukleinsäure, welche ganz oder teilweise zu zumindest einem Teil eines „sense“-Stranges einer für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges codierenden Nukleinsäure komplementär ist. Die Herstellung derartiger „antisense“-Nukleinsäuren auf biologische oder enzymatisch/chemische Weise ist dem Fachmann geläufig. In einer weiteren Ausführungsform kann eine entsprechende Inhibition auch über eine Beeinflussung von regulativen Elementen, z.B. durch spezifische DNA-bindende Faktoren, erfolgen, welche die Expression des Zielgens modulieren. Regulative Elemente sind beispielsweise Promotoren, Enhancer, „locus control regions“, Silencer oder jeweils Teile davon. Bevorzugt kann auch durch „RNA interference“ (RNAi) mittels doppelsträngiger RNA eine Regulierung hervorgerufen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen. „Gehirnzellenähnliche Zellen“ sind dabei dadurch charakterisiert, dass sie wesentliche morphologische bzw. funktionale Merkmale von Gehirnzellen aufweisen. Eine solche Zelle exprimiert bestimmte Markerproteine, beispielsweise exprimiert eine neuronähnliche Zelle mindestens eines der Markerproteine β_3 -Tubulin, MAP2a oder MAP2b. Eine

astrocytenähnliche Zelle exprimiert GFAP, während eine oligodendrocytäre Zelle OCT und/oder O4 exprimiert. Weiterhin weist eine gehirnzellenähnliche Zelle eine typische Form auf und ähnelt in ihrer Morphologie dabei einer Gehirnzelle, z.B. durch die typischen Fortsätze. Neuronenähnliche Zellen können außerdem Aktionspotentiale bilden und besitzen ein Membranpotential.

Die Erfindung betrifft außerdem eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der gegebenenfalls als weiterer Schritt eine Bestimmung der Konzentration eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs erfolgt. Dazu wird die Menge des Proteins quantifiziert und mit der Menge desselben Proteins in einer unbehandelten Vergleichszelle, bei der keine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges inhibiert wurde, verglichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei dem Protein, dessen Konzentration bestimmt wird, um β -Catenin. β -Catenin wird im Zuge des Wnt-Signaltransduktweges phosphoryliert, phosphoryliertes β -Catenin wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Die Anwesenheit einer größeren Menge des Proteins (verglichen mit einer unbehandelten Vergleichsprobe) zeigt also eine Inhibierung des Wnt-Signaltransduktionsweges an.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der Protein-, insbesondere der β -Catenin-Konzentration durch einen Antikörper. Ein β -Catenin-spezifischer Antikörper ist kommerziell erhältlich (Chemicon International, Temecula, USA).

Der Begriff „Antikörper“ wird im Bezug auf diese Erfindung im weitesten Sinne verstanden, und schließt monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, humane oder humanisierte Antikörper, rekombinante Antikörper, single chain Antikörper, synthetische Antikörper sowie Antikörperfragmente (z. B. Fab, $F(ab)_2$ und F_v) ein, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen. Die Antikörper oder Fragmente können allein oder in Mischungen verwendet werden. Die Herstellung dieser Antikörper ist dem Fachmann geläufig. Zum Zwecke der Detektion wird ein solcher Antikörper bevorzugt mit einer detektierbaren Verbindung markiert sein.

Bevorzugt erfolgt die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch eine Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3. Besonders bevorzugt ist dabei die Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta.

5

Inhibierung bedeutet auch in diesem Zusammenhang eine teilweise, im Wesentlichen vollständige oder vollständige, auf unterschiedlichste zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung einer Reaktion des Signaltransduktionsweges, und ist weit auszulegen.

10

Ein(er) oder mehrere Inhibitor(en) zur Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 kann/können bevorzugt ausgewählt sein aus der Gruppe der Kinase-Inhibitoren, Estrogen-Analoga, Phytoestrogene, Corticoide oder Salze, insbesondere 4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiazolidine-3,5-dion, 2-Thio(3-iodobenzyl)-5-(1-pyridyl)-[1,3,4]-oxadiazol, 3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dion, 3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dion, Lithiumsalze und der Berylliumsalze. Außerdem können auch Alkali- bzw. Erdalkalimetalle als Inhibitoren fungieren. Ferner können modifizierte Formen der oben genannten Inhibitoren verwendet werden,

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als entsprechender Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) eingesetzt.

25 Dabei wird Genistein in einer zur Inhibition geeigneten Konzentration verwendet, bevorzugt in einer Konzentration von 10-250 $\mu\text{mol/l}$, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 40-60 $\mu\text{mol/l}$. Weniger bevorzugt ist eine Konzentration von 250 μmol bis 1 mmol.

30 Bevorzugt kann die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs auch durch mindestens einen Antagonisten des Rezeptors „Frizzled“ erfolgen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich "Antagonist" auf eine Substanz, die wirksame physiologische Transmitter bzw. deren Analoga von einem Rezeptor verdrängen kann, jedoch nicht zur Auslösung einer physiologischen Reaktion und Signalweitergabe befähigt ist, und somit den Rezeptor blockiert.

5

Ein alternativer Weg zur Entwicklung von den erfindungsgemäßen Antagonisten besteht im rationalen Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Hierbei wird die Struktur oder eine Teilstruktur des Rezeptors benutzt, um mittels Molecular Modelling Programmen Strukturen zu finden, für die sich
10 eine hohe Affinität an den Rezeptor vorhersagen lässt. Diese Substanzen werden synthetisiert und dann auf ihre Wirkung getestet.

15

Bevorzugt kann der mindestens eine Antagonist des Rezeptors „Frizzled“ ausgewählt sein aus der Gruppe der Secreted Frizzle related Proteins (sFRP), Dickkopf (Dkk), Wnt, Fzd, Frat, Nkd, „VANG1/STB2, ARHU/WRCH1, ARHV/WRCH2, GIPC2, GIPC3, betaTRCP2/FBXW1B, SOX17, TCF-3, WIF-1, Cerberus, Sizzled, Crescent, Coco, Soggy, Kremen und low-density-lipoprotein-receptor-related proteins (LRP).

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, die als „Ausgangspunkt“ der Verfahren verwendet werden, um Zellen ausgewählt aus der Gruppe der Neuroblastom-Zellen, PC12-Zellen, Zellen neuronaler Primärkulturen und 293-Zellen.

25

Ferner betrifft die Erfindung Zellen, die nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt wurden (erhältlich sind) sowie einen neurologischen Gewebeersatz, der solche Zellen enthält. Von einem Patienten durch Biopsie isolierte Zellen werden dazu nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren gezüchtet und dann in diesen oder einen anderen Patienten reimplantiert. Es ist auch möglich, Zellen anderer Säugetiere als Menschen für diesen Zweck zu nehmen, etwa Zellen von Affen, Schweinen, Schafen, Ratten, Mäusen,
30 Kühen, Hunden etc.. Die Transplantation von in vitro differenzierten embryonalen Zellen ist ein etabliertes Verfahren. Auch undifferenzierte neuronale Progenitoren wurden bereits transplantiert

Zusätzlich ist eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens adulter neuronaler Stammzellen in vivo durch die erfindungsgemäßen Medikamente in den beschriebenen Anwendungsformen möglich.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft (Screening-) Verfahren zum Auffinden und zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signalweg hemmen und zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen, bzw. von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, geeignet sind. Ein solches Verfahren kann folgende Schritte umfassen:
- 10 c) das in Kontakt bringen der Zellen mit der Substanz,
 - d) das Bestimmen der β -Catenin-Konzentration in den Zellen,
 - e) das Vergleichen mit einer geeigneten Vergleichszelle, und
 - f) das Nachweisen der Differenzierung der Zellen.

15 Zum Zweck der Auffindung dieser Substanzen können auch direkte oder indirekte Detektionsverfahren verwendet werden, wie Sie dem Fachmann zur Auffindung von Interaktionspartnern geläufig sind. Diese Verfahren umfassen beispielsweise

- Antikörperselektionstechniken
- eine Reihe von Verfahren, die unter dem Begriff „Yeast-N-Hybrid“ Systeme zusammengefasst werden, z. B. das Yeast-20 2-Hybrid-System
- Phagen-Display-Systeme
- Immunopräzipitationen
- Immuno-Assays wie ELISA oder Western-Blot
- Reporter-Testsysteme
- 25 • Durchmustern von Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen
- „Molecular modelling“ unter Verwendung von struktur-Informationen der Wnt-Signaltransduktionsproteine
- Microarray
- 30 • Proteinarray
- Antikörperarray
- Massenspektrometrie- bzw. HPLC-basierte Screeningsysteme.

Die in diesen Verfahren gefundenen Interaktionspartner werden anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Wnt-Signalweg zu hemmen und zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu führen.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von Medikamenten zur Behandlung oder zur Prophylaxe von Krankheiten, die durch Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs positiv beeinflusst werden können. Insbesondere zählen zu diesen Krankheiten Erkrankungen oder Beschwerden, die direkt oder indirekt den Tod von Gehirnzellen zur Folge haben.

10 Die erfindungsgemäßen Medikamente können dabei entweder nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren behandelte Zellen, und/oder Substanzen, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren, insbesondere Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3 und/oder Antagonisten des Rezeptors Frizzled und/oder Antikörper
15 gegen Proteine des Wnt-Signaltransduktionswegs enthalten.

Die Wirkstoffe werden in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht, welche sich routinemäßig, gemäß Techniken zur Ermittlung des Dosierungsbereiches, von einem Fachmann auf dem relevanten Arbeitsgebiet bestimmen lässt.

20 Bei den Krankheiten kann es sich beispielsweise um zerebrale Fehlbildungen und zerebrale Entwicklungsstörungen wie infantile Zerebralpareesen, Fehlbildungen des kraniozervikalen Übergangs oder dysraphische Syndrome handeln. Außerdem zählen zu diesen Krankheiten degenerative und atrophische Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, wie senile und
25 präsenile Hirnatropien, beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Binswanger oder Morbus Pick. Auch Stammganglienerkrankungen wie Morbus Huntington und HDL2, Chorea, Athesose und Dystonie gehören zu den Erkrankungen, welche mittels der erfindungsgemäßen Medikamente behandelt werden können. Weiterhin seien spongioformen Enzephalopathien genannt, sowie Pyramidenbahn- und
30 Vorderhorndegenerationen, beispielsweise Amyotrophe Lateralsklerose, spinale Muskelatropie und progressive Bulbärparalyse genannt. Ebenfalls kann es sich um degenerative Ataxien, wie Morbus Friedreich, Morbus Refsum oder spinocerebelläre Ataxien Typ 1-25 handeln. Ferner sind metabolischen und toxischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, wie hereditäre Stoffwechselerkrankungen des Aminosäuren-,
35 Lipid-, Kohlenhydrat- und Metallionen-Stoffwechsels insbesondere Morbus Wilson durch die erfindungsgemäßen Medikamente behandelbar. Weiterhin seien Multiple Sklerose und

andere Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, Gehirn und Rückenmarkstumore und traumatische Schädigungen des Nervensystems aufgezählt. Auch Durchblutungsstörungen des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere Hirninfarkte und andere Formen des Schlaganfalls sowie Muskelerkrankungen, die auf eine Schädigung
5 des Nervensystems beruhen insbesondere posttraumatischen Muskelatropien sind durch die erfindungsgemäßen Medikamente behandelbar.

Weiterhin bevorzugt sind Modifikationen oder Formulierungen der erfindungsgemäßen Medikamente, durch die die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, erhöht wird,
10 bzw. sich der Verteilungskoeffizient zum Hirngewebe hin verschiebt. Beispiele für solche Modifikationen sind die Addition einer Proteintransduktionsdomäne (ptd) oder von tat-Sequenzen. Außerdem können Kernlokalisationssequenzen (NLS) bzw. Kerntranslokationssequenzen (NTS) verwendet werden.

15 Ebenso bevorzugt ist die Zugabe aller Substanzen zu den erfindungsgemäßen Medikamenten, durch die ihre therapeutische Wirkung unterstützt wird. Dieser Effekt kann dabei kumulativ, oder überadditiv sein. Für diesen Zweck geeignet sind z.B. Substanzen mit neuroprotektiven Eigenschaften, wie Erythropoietin, BDNF, VEGF, CTNF, GCSF und GMCSF und Entzündungsbeeinflussende Medikamente.

20 Die erfindungsgemäßen Medikamente lassen sich gemäß den im Fachgebiet verfügbaren Standardverfahren formulieren. So kann beispielsweise ein pharmazeutisch unbedenklicher Trägerstoff (oder Hilfsstoff) zugegeben werden. Geeignete Träger- bzw. Hilfsstoffe sind dem Fachmann geläufig. Bei dem Träger- oder Hilfsstoff kann es sich um ein festes,
25 halbfestes oder flüssiges Material handeln, das als Vehikel oder Medium für den wirksamen Bestandteil dient. Dem Fachmann mit Normalwissen auf dem Gebiet der Herstellung von Zusammensetzungen ist es leicht möglich, die geeignete Verabreichungsform und -art je nach dem jeweiligen Eigenschaften des ausgewählten Wirkstoffes, der zu behandelnden Erkrankung bzw. des zu behandelnden
30 Krankheitszustands, dem Stadium der Erkrankung sowie anderen relevanten Umständen auszuwählen (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (1990)). Der Anteil und die Beschaffenheit des pharmazeutisch unbedenklichen Träger- oder Hilfsstoffs werden durch Löslichkeit und die chemischen Eigenschaften des ausgewählten Wirkstoffes festgelegt.

Die Medikamente werden besonders bevorzugt durch direkte interzerebrale Injektion in das Gehirn oder als intraventrikuläre Injektion verabreicht. Vorzugsweise können sie auch intravenös, als Tablette oder als Nasenspray verabreicht werden. Auch ein Gentransfer durch modifizierte Adenoviren ist ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung.

5

Ferner betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zum Auffinden und zur Identifizierung von Substanzen (Screeningverfahren) zum Nachweis von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen, umfassend die Verfahrensschritte

10

- i) das Bestimmen der Konzentration von β -Catenin, und
- ii) das Vergleichen der bestimmten Konzentration aus i) mit der β -Catenin-Konzentration einer geeigneten Vergleichszelle.

15

Als Vergleichszelle kann hier ebenfalls wieder eine nicht mit der entsprechenden Substanz behandelte Zelle herangezogen werden. Bei einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Bestimmung der Konzentration von β -Catenin durch einen Antikörper.

20

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von β -Catenin als diagnostischem Marker zur Identifizierung von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen. Der Nachweis kann auch, unter anderem, durch einen Antikörper erfolgen.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante, neuronale Stammzelle bzw. eine von einer neuronalen Stammzelle abgeleitete Zelle. Diese Zellen enthalten ein Nukleinsäurekonstrukt, das für ein Polypeptid codiert, welches zur Inhibierung einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges führt. Die Zellen werden zur in vitro Differenzierung der Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen eingesetzt.

30

Das Nukleinsäurekonstrukt beinhaltet dabei eine für ein inhibitorisch wirkendes Protein codierende Nukleinsäure unter der Kontrolle eines Promotors. Der Promotor kann hierbei jeder bekannte Promotor sein, der in der Wirtszelle, in die das Nukleinsäurekonstrukt eingebracht werden soll, aktiv ist, d.h. in dieser Wirtszelle die Transkription des nachgeschalteten Proteins aktiviert. Der Promotor kann hierbei ein konstitutiver Promotor sein, welcher das nachgeschaltete Protein ständig exprimiert, oder ein nicht-konstitutiver

Promotor, der nur zu definierten Zeitpunkten im Laufe der Entwicklung oder unter bestimmten Umständen exprimiert.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt kann gegebenenfalls weitere
5 Kontrollsequenzen enthalten. Unter einer Kontrollsequenz wird eine beliebige Nukleotidsequenz verstanden, die die Expression des inhibitorischen Polypeptides beeinflusst, wie insbesondere der Promotor, eine Operatorsequenz, d.h. die DNA-Bindungsstelle für einen Transkriptionsaktivator oder einen Transkriptionsrepressor, eine Terminator-Sequenz, eine Polyadenylierungssequenz oder eine Ribosomenbindungsstelle.

10

Außerdem kann das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt eine Nukleinsäuresequenz enthalten, durch die der Vektor sich in der betreffenden Wirtszelle replizieren kann. Solche Nukleotidsequenzen werden in der Regel „origin of replication“ (deutsch: Replikationsursprung) genannt. Beispiele für solche Nukleotidsequenzen sind der SV40-
15 Replikationsursprung, der in Säugetier-Wirtszellen zum Einsatz kommt.

Das Nukleinsäurekonstrukt kann weiterhin einen oder mehrere Selektionsmarker enthalten. Unter einem Selektionsmarker versteht man ein Gen, welches unter der Kontrolle eines Promotors steht und welches für ein Protein codiert, das einen physiologischen Defekt der
20 Wirtszelle komplementiert. Selektionsmarker stellen insbesondere das Gen codierend für die Dihydrofolat Reduktase (DHFR) dar, oder auch ein Gen, welches die Resistenz gegen Antibiotika, wie insbesondere Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Blastidicin, Gentamycin, Chloramphenicol, Neomycin oder Hygromycin bewirkt.

25 Eine große Anzahl von rekombinanten Vektoren zur Expression eines Zielproteins in Wirtszellen ist nach dem Stand der Technik bekannt, viele von ihnen sind auch kommerziell erhältlich.

Außerdem kann das inhibitorisch wirkende Protein auch als Fusionsprotein exprimiert
30 werden. Dabei wird dem zu exprimierenden Protein eine Anzahl von Aminosäuren N- oder C-terminal angefügt. Diese können beispielsweise die Funktion haben, die Expression des rekombinanten Proteins zu steigern, seine Löslichkeit zu verbessern, dessen Aufreinigung zu erleichtern oder dessen Nachweisbarkeit zu ermöglichen.

Weiterhin kann die Zelle mit dem Nukleinsäurekonstrukt stabil oder transient transfiziert worden sein.

- 5 Transfektion oder Transformation meint jegliche Art von Verfahren, die zur Einbringung einer Nukleinsäuresequenz in einen Organismus verwendet werden kann. Für diesen Vorgang steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

10

Unter einer transienten Transformation wird das Einbringen eines Nukleinsäurekonstruktes in eine Zelle verstanden, wobei sich das Nukleinsäurekonstrukt nicht in das Genom der transformierten Zelle integriert. Bei einer stabilen Transformation dagegen erfolgt eine Integration des Nukleinsäurekonstrukts, bzw. von Teilen des Konstruktes, in das Genom

15 der transformierten Zelle.

15

Ferner betrifft die Erfindung die Differenzierung einer rekombinanten, neuronalen Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden

20 Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird, zu gehirnzellenähnlichen Zellen.

20

Bevorzugterweise ist dabei mindestens ein für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs codierendes Gen oder ein an der Expression dieses Gens beteiligter DNA-Abschnitt komplett deletiert, teilweise deletiert oder weist eine

25 Mutation auf.

25

„Mutationen“ umfassen dabei Substitutionen, Additionen oder Deletionen eines oder mehrerer Nukleotide. Unter „Substitution“ ist der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Addition“ bezeichnet das

30 Hinzufügen von einem oder mehreren Nukleotiden. „Deletion“ ist das Entfernen eines oder mehrerer Nukleotide.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, die ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins umfasst, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Kit zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

Bei in beiden Kits enthaltenen Zellen wurden bereits zuvor ausführlich beschrieben. Ferner können die Kits weitere Gegenstände und Substanzen umfassen, wie Versuchsanleitungen, Medien, Medienzusätze, etc..

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die Zeichnung näher erläutert:

Sie zeigt in

Fig. 1 die semiquantitativen Veränderungen von Proteinen des Wnt-Signaltransduktionsweges vor und nach dem Differenzierungsprotokoll. Dazu wurde ein Proteinextrakt aus adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen nach isoelektrischem Punkt (1. Dimension) und Molekulargewicht (2. Dimension) aufgetrennt. Identifizierte Proteinspots des Wnt-Signalweges wurden zur Identifizierung ausgestanzt und massenspektrometrisch untersucht,

Fig. 2 Ergebnisse der funktionellen Analyse des Wnt-Signalweges in differenzierten und undifferenzierten adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen mit Hilfe des Western Blots. Beta-Catenin wurde durch spezifische Antikörper in den Proteinextrakten aus adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen sichtbar gemacht. (A) zeigt Ergebnisse

für undifferenzierte Zellen, ohne Blockade des Wnt-Signalweges, (B) für undifferenzierte Zellen, mit Blockade des Wnt-Signalweges durch Genistein, (C) für die Negativkontrolle, (D) für differenzierte Zellen, ohne Blockade des Wnt-Signalweges, (E) differenzierte Zellen, mit Blockade des Wnt-Signalweges durch Genistein,

5

Fig. 3 die semiquantitative Darstellung der Ergebnisse aus Abb 3. Die Expression von β -Catenin kann nach Gabe von Genistein etwa um Faktor 2 gesenkt werden,

10

Fig. 4 differenzierte neuronale Stamm- und Progenitorzellen in der Zellkultur nach dem Differenzierungsprotokoll, und in

Fig. 5 eine schematische Darstellung des Wnt-Signaltransduktionsweges.

15

Beispiel 1: Identifizierung des Wnt-Signalwegs in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen

20

Aus kultivierten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen wird ein Proteinextrakt isoliert, in dem durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese Proteine des Wnt-Signalweges identifiziert werden.

25

Neuronale Stammzellen werden aus Hippokampus, Bulbus olfaktorius und Subventrikulärzone aus dem Gehirn 4-6 Wochen alter Ratten in einem dem Fachmann bekannten Verfahren isoliert (Gage FH et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 11879-11883; Gage FH et al., 2000, WO2000047718A1, ; Ray J et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90, 3602-3606; Reynolds BA and Weiss S, 1992, Science, 255, 1707-1710.; Weiss S et al., 1994, WO1994009119A1). Dazu werden die Gehirne entnommen und in 50 ml eiskalter Dulbeccos phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS) supplementiert mit 4.5 g/l Glukose (DPBS/Glc) gewaschen. Die genannten Hirnregionen aus 6 Tieren werden disseziert, in 10 ml DPBS/Glc gewaschen und für 5 min bei 1600 g und 4 °C zentrifugiert.

30

Nach Entfernen des Überstandes wird das Gewebe mechanisch zerkleinert. Die Gewebsstücke werden mit DPBS/Glc-Medium für 5 min bei 800 g gewaschen und die drei Pellets in 0.01 % (w/v) Papain, 0.1 % (w/v) Dispase II (neutrale Protease), 0.01 % (w/v)

DNase I, und 12.4 mM MnSO₄ in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert. Das Gewebe wird mit Plastikpipettenspitzen trituriert und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min durchmischt wird. Die Lösung wird für 5 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets drei Mal in 10 ml DMEM-Ham's F-12-Medium supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin gewaschen. Die Pellets werden in 1 ml Neurobasal-Medium supplementiert mit B27 (Invitrogen, Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin, 20 ng/ml Endothelial Growth Factor (EGF), 20 ng/ml Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) und 2 µg/ml Heparin resuspendiert. Die Zellen werden unter sterilen Bedingungen in geeigneten Kulturschalen (BD Falcon, Heidelberg) in einer Konzentration von 25,000-100,000 Zellen/ml ausgebracht. Die Kulturschalen werden bei 37 °C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Kulturmedium wird ein Mal pro Woche gewechselt, wobei etwa zwei Drittel ersetzt werden und ein Drittel als konditioniertes Medium beibehalten wird.

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese werden die Stamm- und Progenitorzellen nach 5 Passagen von jeweils etwa 14 Tagen 3 Mal in 300 mosmol/l Tris-HCl -Saccharose, pH 7.4, gewaschen und in einem Probenpuffer bestehend aus 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) IPG buffer pH 3-10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), 100 mM DTT and 1.5 mg/mL Complete protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany) für 1 hour bei Raumtemperatur in einem Orbitalschüttler lysiert. Das Lysat wird dann bei 21000 x g für 30 min zentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes nach der Bradfordmethode bestimmt (Bradford MM, 1976, Anal Biochem, 72, 248-254).

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wird nach Standardprotokollen ausgeführt (Görg A et al., 2000, Electrophoresis, 21, 1037-1053). Proben von 500 µg werden zur isoelektrischen Fokussierung auf 18 cm lange, nicht-lineare pH 3-10 Gradienten-IEF-Gelstreifen aufgetragen (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). Nach 12 h Schwellzeit bei 30 V werden 200 V für 1 h, 500 V für 1 h und 1000 V für 1 h angelegt. Danach wird die Spannung auf 8000 V erhöht und über 12 h konstant gehalten. Daraus ergeben sich 100300 Vh auf dem IPGphor IEF System (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) für die isoelektrische Fokussierung. Die Trennung in der zweiten Dimension wird in 12.5 % Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von 10 % SDS vollzogen. An die Gele (180 x 200 x 1.5 mm³) werden 30 mA für 30 min und 100 mA für etwa 4 h in einer

wassergekühlten vertikalen Elektrophoresekammer angelegt (OWL Scientific, Woburn, MA, USA). Die Gele werden nach einem modifizierten Protokoll (Blum H et al., 1987, Electrophoresis, 8, 93-99) mit Silbernitrat gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Diese Methode ist kompatibel mit einer sich anschließenden Massenspektrometrie. Die Gele werden dann eingescannt und die Bilder densitometrisch vermessen mit der speziellen Software Phoretix 2D Professional (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle-upon-Tyne, UK). Nach einer Hintergrundkorrektur werden die Proteinpunkte des Wnt-Signalweges nach optischer Dichte und Volumen vermessen. Die Proteine werden durch Massenspektrometrie identifiziert (Proteosys AG, Mainz). (Fig. 1)

Beispiel 2: Nachweis der Regulation der identifizierten Proteine in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen durch Differenzierung in vitro

Die Differenzierung der adulten neuronalen Stammzellen wird durch Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF aus dem Medium und Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) ausgelöst. Dazu werden die Zellen aus den Kulturschalen entnommen, in Kulturmedium für 10 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert und drei Mal in 10 ml DPBS bei 800 g und 4 °C gewaschen. Die Zellen werden enzymatisch vereinzelt und in einer neuen Kulturschale in 4 ml Neurobasal-Medium supplementiert mit B27 (Invitrogen, Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin und 2 µg/ml Heparin resuspendiert. Zusätzlich werden dem Medium 5% fetales Kälberserum zugesetzt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in geeigneten Kulturschalen (BD Falcon, Heidelberg) in einer Konzentration von 25,000-100,000 Zellen/ml ausgebracht. Die Kulturschalen werden bei 37 °C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre für zwei Tage inkubiert.

Die in vitro differenzierten Zellen werden mittels der zwei-dimensionalen Elektrophorese (s.o., Bsp. 1) untersucht und die Ergebnisse für die optischen Dichten der Proteinpunkte mit denen für undifferenzierte Zellen mit statistischen Testverfahren verglichen. Dazu wird ein t-Test nach Student verwendet, ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant angesehen. Dabei konnten die Proteine Pontin 52, Proteasom-Untereinheit alpha-1 und Proteasom-Untereinheit alpha-6 (Tabelle 1) als reguliert exprimiert identifiziert werden (Fig. 2).

GenBank-annotation	Theor. pI	Theor. MW (Da)	Experim. MW (Da)	Mass score	Method of Identification	Regulation % up-reg. in undiff.	Induction factor	Induction factor
RuvB-like protein 1; Pantin 52	6.02	50524	52000	178	MALDI-TOF	59.5	1.6	1.6
adenomatosis polyposis coli binding protein Ebi1	5.02	30168	31000	65	MALDI-TOF	56.0	0.4	-2.3
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	6.14	29784	30000	77	MALDI-TOF	47.8	1.5	1.5
expressed sequence C87222	5.12	23450	27000	129	MALDI-TOF	-0.3	1.0	-1.0
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6	6.35	27838	27000	97	MALDI-TOF	30.4	1.3	1.3

5

Beispiel 3: Nachweis der Regulation von beta-Catenin nach Differenzierung und Inhibition des Wnt-Signalweges

Für die Inhibition des Wnt-Signalweges wird der unspezifische Kinaseinhibitor Genistein in einer Konzentration von 50 μ M zugesetzt, um die Wirkung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) zu inhibieren (Murase S et al., 2002, Neuron, 35, 91-105.).

Danach wird ein Proteinextrakt (s.o., Beispiel 1) angefertigt und das Protein beta-Catnin durch eindimensionale Gelelektrophorese und Western Blotting identifiziert (Fig. 3, Fig. 4).

Die Proteinextrakte der adulten neuronalen Stammzellen werden zunächst in Lämmli-Puffer bestehend aus 2% (w/v) Natriumdodecylsulfat, 10% (v/v) Glycerol, 100 mM Dithiothreitol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.001% Bromphenolblau und 5% 2-Mercaptoethanol in einem 12% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch das „semi-dry blotting“-Verfahren (Kyhse-Andersen J, 1984, J Biochem Biophys Methods, 10, 203-209.) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S83, 0.2 μ m, Schleicher & Schnell, Dassel) aufgebracht. Die Membran wird mit einem geeignet Reagenz inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu unterdrücken, für 1 h inkubiert (Seablock, Pierce, Rockford, IL, USA) und dann über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper (beta-Catenin, 1:5000, BD Biosciences, Heidelberg) in TBST aus 60 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 und 0.1 % (v/v) Tween 20 inkubiert. Am folgenden Tag werden die Membranen 3 x 5 min in TBST gewaschen und der Zweitantikörper (ImmunoPure Rabbit Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated, Pierce, Rockford, IL, USA) in einer Verdünnung von 1:20.000 in TBST, für 2 h aufgebracht. Die Antikörperbindung wird durch Chemilumineszenz-Signale nachgewiesen. Die Chemilumineszenz-Signale werden unter Verwendung eines geeigneten

Substrates (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) für 30 s auf Röntgenfilmen aufgenommen. Die Röntgenfilme werden entwickelt und densitometrisch vermessen. Die Ergebnisse für undifferenzierte Zellen ohne Inhibition des Wnt-Pfades, undifferenzierte Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades, differenzierte Zellen ohne Inhibition des Wnt-Pfades und differenzierte Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades wurden verglichen (Fig. 4). Dabei findet sich eine etwa zweifache Reduktion der beta-Catenin-Expression in den Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend
- (a) das in Kontakt bringen der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibiert, und
- 10 (b) das Kultivieren dieser Zellen unter Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen zu
- 15 gehirnzellenähnlichen Zellen differenzieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass gegebenenfalls als Schritt (c) eine Bestimmung der Konzentration eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs erfolgt.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Protein-Konzentration durch einen Antikörper erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem
- 25 Protein um β -Catenin handelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch eine Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 erfolgt.
- 30 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 durch mindestens einen Inhibitor erfolgt, der ausgewählt ist aus der Gruppe der Kinase-Inhibitoren, Estrogen-Analoga, Phytoestrogene, Corticoide und Salze, insbesondere 4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiazolidine-3,5-dion, 2-Thio(3-iodobenzyl)-5-(1-pyridyl)-[1,3,4]-oxadiazol, 3-
- 35

(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dion, 3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dion, Lithiumsalze, Berylliumsalze.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor Genistein ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Genistein in einer Konzentration von 10-250 µmol/l eingesetzt wird.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch mindestens einen Antagonisten des Rezeptors Frizzled erfolgt.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antagonist ausgewählt ist aus der Gruppe Secreted Frizzle related Proteins (sFRP), Dickkopf (Dkk), Wnt, Fzd, Frat, Nkd, VANG1/STB2, ARHU/WRCH1, ARHV/WRCH2, GIPC2, GIPC3, betaTRCP2/FBXW1B, SOX17, TCF-3, WIF-1, Cerberus, Sizzled, Crescent, Coco, Soggy, Kremen und low-density-lipoprotein-receptor-related proteins (LRP).
- 20 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen um Zellen ausgewählt aus der Gruppe der Neuroblastom-Zellen, PC12-Zellen, Zellen neuronaler Primärkulturen und 293-Zellen handelt.
- 25 13. Zelle, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. Neurologischer Gewebeersatz, enthaltend Zellen nach Anspruch 13.
- 30 15. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend Zellen nach Anspruch 13.
16. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signaltransduktionsweg hemmen und zur Differenzierung neuronaler

Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen geeignet sind, umfassend

- (c) das in Kontakt bringen der Zellen mit der Substanz,
 - (d) das Bestimmen der β -Catenin-Konzentration in den Zellen,
 - (e) das Vergleichen mit einer geeigneten Vergleichszelle, und
 - (f) das Nachweisen der Differenzierung der Zellen.
- 5
17. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3, Antagonisten des Rezeptors Frizzled und/oder Antikörper gegen Proteine des Wnt-Signaltransduktionswegs.
- 10
18. Mittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 um Genistein handelt.
- 15
19. Verwendung eines pharmazeutischen Mittels nach einem der Ansprüche 15, 17 und 18 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Krankheiten, die durch Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs positiv beeinflusst werden können.
- 20
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Krankheit um eine Krankheit ausgewählt aus folgenden Gruppen handelt, der Gruppe der zerebralen Fehlbildungen, insbesondere der zerebralen Entwicklungsstörungen, infantilen Zerebralparesen, Fehlbildungen des kraniozervikalen Übergangs und dysrhapischen Syndrome,
- 25
- der Gruppe der degenerativen und atropischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere der senilen und präsenilen Hirnatropien, insbesondere Morbus Alzheimer, Morbus Binswanger und Morbus Pick,
- 30
- der Gruppe der Stammganglienerkrankungen, insbesondere Morbus Huntington und HDL2, Chorea, Athesose und Dystonie, spongioformen Enzephalopathien,
- der Gruppe der Pyramidenbahn- und Vorderhorndegenerationen, insbesondere Amyotrophe Lateralsklerose, spinale Muskelatropie und progressive Bulbärparalyse,
- 35
- der Gruppe der degenerativen Ataxien, insbesondere Morbus Friedreich, Morbus Refsum und Spinocerebelläre Ataxien Typ 1-25,

der Gruppe der metabolischen und toxischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, Morbus Wilson, Multipler Sklerose, Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, Gehirn und Rückenmarkstumoren, traumatische Schädigungen des Nervensystems, Durchblutungsstörungen des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere hereditären Stoffwechselerkrankungen des Aminosäuren-, Lipid-, Kohlenhydrat- und Metallionenstoffwechsels, insbesondere Morbus Wilson, multipler Sklerose, Hirninfarkten und anderen Formen des Schlaganfalls, Muskelerkrankungen, die auf eine Schädigung des Nervensystems beruhen und posttraumatischen Muskelatropien.

21. Verwendung von Genistein zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Krankheiten, die direkt oder indirekt den Tod von Gehirnzellen zur Folge haben.

22. Screeningverfahren zum Nachweis von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen, umfassend

- (i) das Bestimmen der Konzentration von β -Catenin, und
- (ii) das Vergleichen der Konzentration aus (i) mit der β -Catenin-Konzentration einer geeigneten Vergleichszelle.

23. Screeningverfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Konzentration von β -Catenin durch einen Antikörper erfolgt.

24. Verwendung von β -Catenin als diagnostischem Marker zur Identifizierung von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen.

25. In vitro Differenzierung rekombinanter, neuronaler Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen, bewirkt durch ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

26. Differenzierung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des Proteins unter der Kontrolle eines konstitutiven oder eines regulierbaren Promotors erfolgt.

27. Differenzierung nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle mit dem Nukleinsäurekonstrukt stabil oder transient transfiziert wurde.

5 28. Differenzierung einer rekombinanten, neuronalen Stammzelle zu gehirnzellenähnlichen Zellen, bewirkt dadurch, dass mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

10

29. Differenzierung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs codierendes Gen oder ein an der Expression dieses Gens beteiligter DNA-Abschnitt komplett deletiert ist, teilweise deletiert ist oder eine Mutation aufweist.

15

30. Kit zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, die ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins umfasst, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

20

31. Kit zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

25

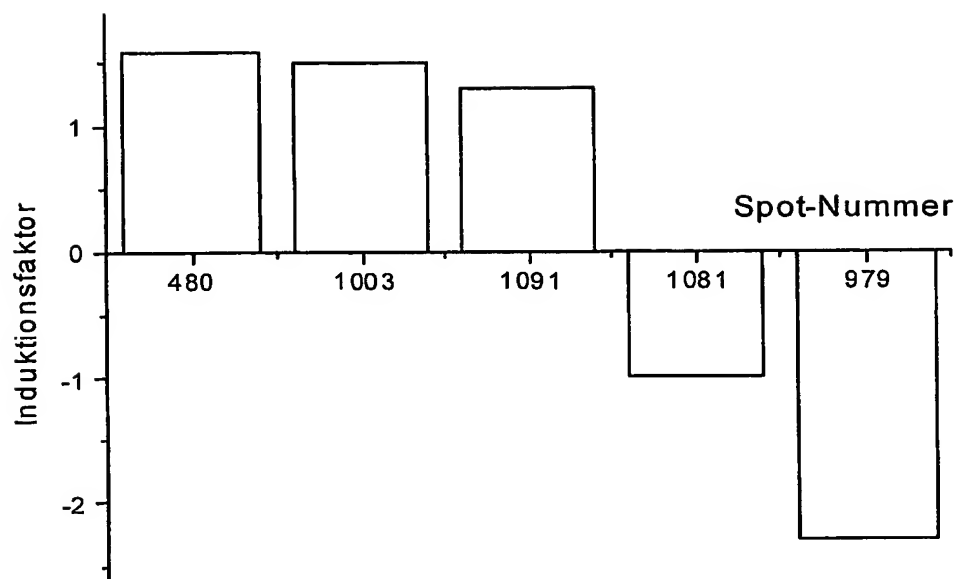
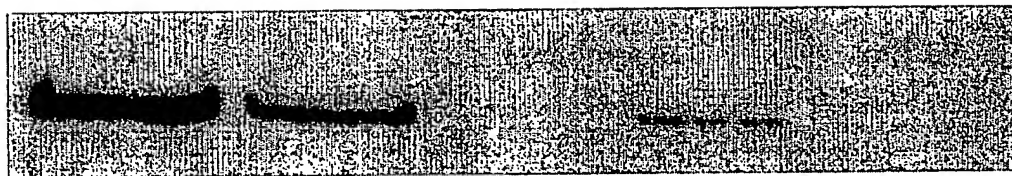
Abb. 1

Abb. 2



A

B

C

D

E

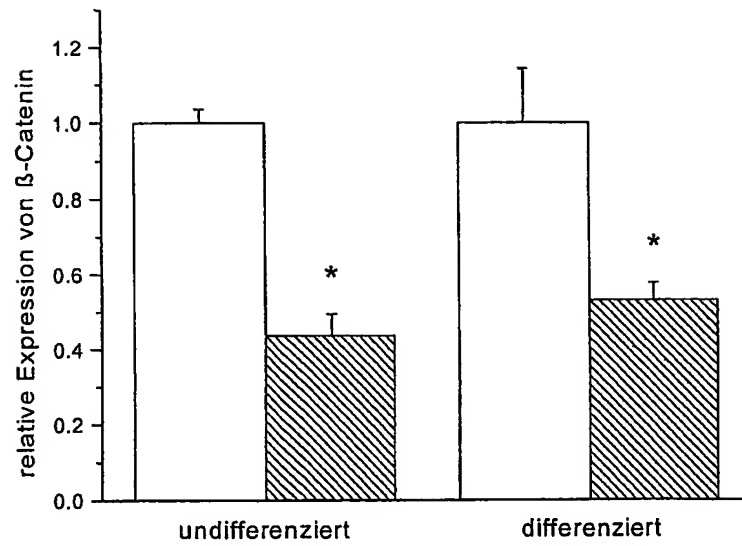
Abb. 3

Abb. 4

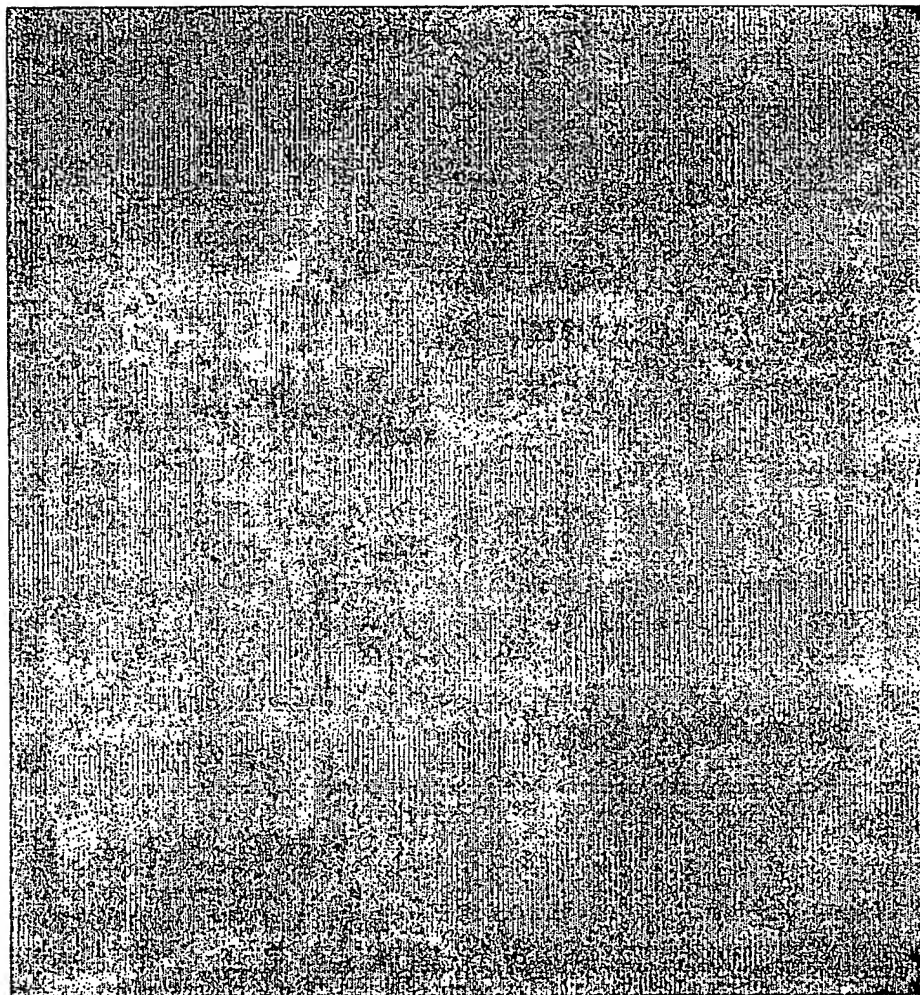
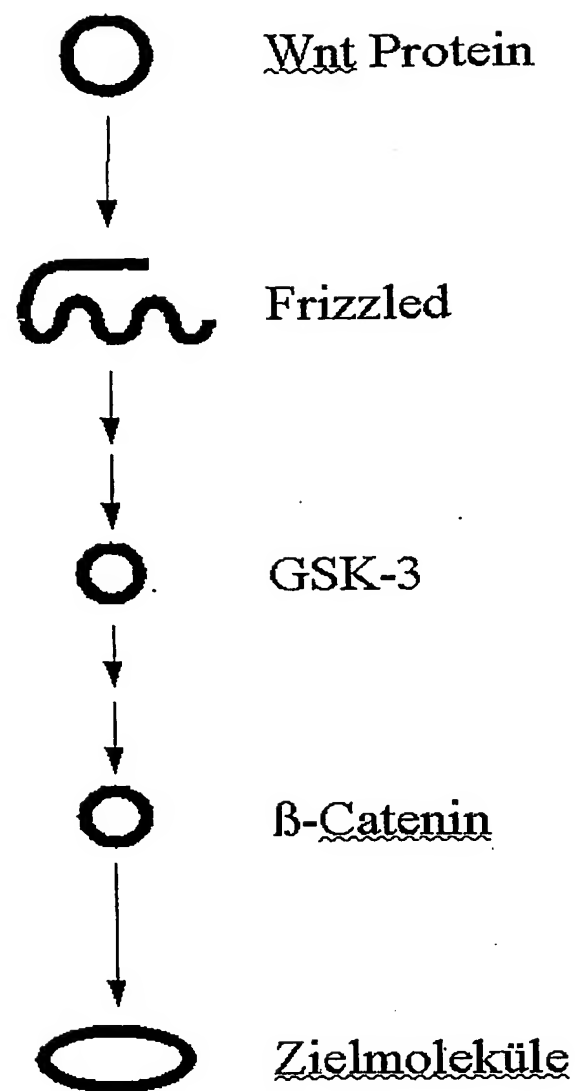


Abb. 5

10/584341

WO 2005/063966

PCT/EP2004/014673

BL62513PC.ST25.LTX
SEQUENCE LISTING

25 JUN 2006 Rec'd PCT/PTO 23 JUN 2006

<110> Axaron Bioscience AG

<120> Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen oder von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen

<130> BL62513PC

<150> DE 103 61 444.3

<151> 2003-12-23

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 781

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(781)

<223> beta-Catenin

<400> 1

Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp Met Ala Met Glu Pro
1 5 10 15

Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln Gln Ser Tyr Leu Asp
20 25 30

ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Leu Ser Gly
35 40 45

Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr Ser Gln Val Leu Tyr
50 55 60

BL62513PC.ST25.txt

Glu Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Ala
65 70 75 80

Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala Gln Arg Val Arg Ala
85 90 95

Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met Gln Ile Pro Ser Thr
100 105 110

Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg Leu Ala Glu Pro
115 120 125

Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu Ile Asn Tyr Gln Asp
130 135 140

Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala Ala Val Met Val His
165 170 175

Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala Ile Met Arg Ser Pro
180 185 190

Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln Asn Thr Asn Asp Val
195 200 205

Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His Asn Leu Ser His His
210 215 220

Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu
225 230 235 240

Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile
245 250 255

Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala
260 265 270

Val Arg Leu Ala Gly Gly Leu Gln Lys Met Val Ala Leu Leu Asn Lys
275 280 285

Thr Asn Val Lys Phe Leu Ala Ile Thr Thr Asp Cys Leu Gln Ile Leu
290 295 300

Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu Ile Ile Leu Ala Ser Gly Gly
305 310 315 320

Pro Gln Ala Leu Val Asn Ile Met Arg Thr Tyr Thr Tyr Glu Lys Leu
325 330 335

BL62513PC.ST25.txt

Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys Val Leu Ser Val Cys Ser Ser
 340 345 350

Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly Gly Met Gln Ala Leu Gly Leu
 355 360 365

His Leu Thr Asp Pro Ser Gln Arg Leu Val Gln Asn Cys Leu Trp Thr
 370 375 380

Leu Arg Asn Leu Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln Glu Gly Met Glu Gly
 385 390 395 400

Leu Leu Gly Thr Leu Val Gln Leu Leu Gly Ser Asp Asp Ile Asn Val
 405 410 415

Val Thr Cys Ala Ala Gly Ile Leu Ser Asn Leu Thr Cys Asn Asn Tyr
 420 425 430

Lys Asn Lys Met Met Val Cys Gln Val Gly Gly Ile Glu Ala Leu Val
 435 440 445

Arg Thr Val Leu Arg Ala Gly Asp Arg Glu Asp Ile Thr Glu Pro Ala
 450 455 460

Ile Cys Ala Leu Arg His Leu Thr Ser Arg His Gln Glu Ala Glu Met
 465 470 475 480

Ala Gln Asn Ala Val Arg Leu His Tyr Gly Leu Pro Val Val Val Lys
 485 490 495

Leu Leu His Pro Pro Ser His Trp Pro Leu Ile Lys Ala Thr Val Gly
 500 505 510

Leu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Cys Pro Ala Asn His Ala Pro Leu Arg
 515 520 525

Glu Gln Gly Ala Ile Pro Arg Leu Val Gln Leu Leu Val Arg Ala His
 530 535 540

Gln Asp Thr Gln Arg Arg Thr Ser Met Gly Gly Thr Gln Gln Gln Phe
 545 550 555 560

Val Glu Gly Val Arg Met Glu Glu Ile Val Glu Gly Cys Thr Gly Ala
 565 570 575

Leu His Ile Leu Ala Arg Asp Val His Asn Arg Ile Val Ile Arg Gly
 580 585 590

Leu Asn Thr Ile Pro Leu Phe Val Gln Leu Leu Tyr Ser Pro Ile Glu
 595 600 605

BL62513PC.ST25.txt

Asn Ile Gln Arg Val Ala Ala Gly Val Leu Cys Glu Leu Ala Gln Asp
 610 615 620
 Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ile Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Pro Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Leu Leu His Ser Arg Asn Glu Gly Val Ala Thr Tyr Ala Ala
 645 650 655
 Ala Val Leu Phe Arg Met Ser Glu Asp Lys Pro Gln Asp Tyr Lys Lys
 660 665 670
 Arg Leu Ser Val Glu Leu Thr Ser Ser Leu Phe Arg Thr Glu Pro Met
 675 680 685
 Ala Trp Asn Glu Thr Ala Asp Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ala Gln Gly
 690 695 700
 Glu Pro Leu Gly Tyr Arg Gln Asp Asp Pro Ser Tyr Arg Ser Phe His
 705 710 715 720
 Ser Gly Gly Tyr Gly Gln Asp Ala Leu Gly Met Asp Pro Met Met Glu
 725 730 735
 His Glu Met Gly Gly His His Pro Gly Ala Asp Tyr Pro Val Asp Gly
 740 745 750
 Leu Pro Asp Leu Gly His Ala Gln Asp Leu Met Asp Gly Leu Pro Pro
 755 760 765
 Gly Asp Ser Asn Gln Leu Ala Trp Phe Asp Thr Asp Leu
 770 775 780

<210> 2

<211> 420

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(420)

<223> Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta

<400> 2

Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro
 4

BL62513PC.ST25.txt

1

5

10

15

Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys
20 25 30

Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro
35 40 45

Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn
50 55 60

Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu
65 70 75 80

Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg
85 90 95

Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu
100 105 110

Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu
115 120 125

Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg
130 135 140

His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu
145 150 155 160

Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly
165 170 175

Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp
180 185 190

Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val
195 200 205

Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala
210 215 220

Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val
225 230 235 240

Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile
245 250 255

Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val
260 265 270

Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr

BL62513PC.ST25.txt

275

280

285

Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val
 290 295 300

Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu
 305 310 315 320

Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala
 325 330 335

His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys Leu Pro Asn
 340 345 350

Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser
 355 360 365

Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
 370 375 380

Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala
 385 390 395 400

Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala
 405 410 415

Ser Asn Ser Thr
 420

<210> 3

<211> 648

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(648)

<223> Receptor "Frizzled" FZD1

<400> 3

Met Ala Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Ser Arg Ala Ala Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Trp Glu Leu Cys Ala Gly Ala Leu Ser Ala Arg Leu Ala Glu
 20 25 30

BL62513PC.ST25.txt

Glu Gly Ser Gly Asp Ala Gly Gly Arg Arg Arg Pro Pro Val Asp Pro
 35 40 45
 Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Glu Ala
 50 55 60
 Pro Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Gln Ala Ala Gly Gln Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Pro Gly Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln
 85 90 95
 Gln Gln Ser Gly Gln Gln Tyr Asn Gly Glu Arg Gly Ile Ser Val Pro
 100 105 110
 Asp His Gly Tyr Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile
 115 120 125
 Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln
 130 135 140
 Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val
 145 150 155 160
 Gln Cys Ser Ala Glu Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Leu Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys
 180 185 190
 Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe
 195 200 205
 Gln Trp Pro Asp Thr Leu Lys Cys Glu Lys Phe Pro Val His Gly Ala
 210 215 220
 Gly Glu Leu Cys Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Lys Gly Thr Pro Thr
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Leu Pro Glu Phe Trp Thr Ser Asn Pro Gln His Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly His Arg Gly Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ser Glu Arg
 260 265 270
 Gly Lys Phe Ser Cys Pro Arg Ala Leu Lys Val Pro Ser Tyr Leu Asn
 275 280 285
 Tyr His Phe Leu Gly Glu Lys Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Thr
 290 295 300

BL62513PC.ST25.txt

Lys Val Tyr Gly Leu Met Tyr Phe Gly Pro Glu Glu Leu Arg Phe Ser
 305 310 315 320
 Arg Thr Trp Ile Gly Ile Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu
 325 330 335
 Phe Thr Val Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro
 340 345 350
 Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Ala Val Ala Val
 355 360 365
 Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Val Val Cys Asn Asp
 370 375 380
 Lys Phe Ala Glu Asp Gly Ala Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys
 385 390 395 400
 Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala
 405 410 415
 Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala
 420 425 430
 Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe
 435 440 445
 His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Ile Lys Thr Ile Thr Ile Leu
 450 455 460
 Ala Leu Gly Gln Val Asp Gly Asp Val Leu Ser Gly Val Cys Phe Val
 465 470 475 480
 Gly Leu Asn Asn Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu
 485 490 495
 Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val
 500 505 510
 Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr
 515 520 525
 Glu Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu
 530 535 540
 Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln
 545 550 555 560
 Ala Phe Arg Asp Gln Trp Glu Arg Ser Trp Val Ala Gln Ser Cys Lys
 565 570 575

BL62513PC.ST25.txt

Ser Tyr Ala Ile Pro Cys Pro His Leu Gln Ala Gly Gly Gly Ala Pro
 580 585 590

Pro His Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Phe Met Ile Lys Tyr
 595 600 605

Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser
 610 615 620

Gly Lys Thr Leu Asn Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn
 625 630 635 640

Ser Lys Gln Gly Glu Thr Thr Val
 645

<210> 4

<211> 565

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(565)

<223> Rezeptor "Frizzled" FZD 2

<400> 4

Met Arg Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe His Gly Glu Lys Gly Ile Ser
 20 25 30

Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr
 35 40 45

Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
 50 55 60

Asn Gln Glu Asp Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val
 65 70 75 80

Lys Val Gln Cys Ser Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
 85 90 95

Ala Pro Val Cys Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser
 9

BL62513PC.ST25.txt
105

100

110

Ile Cys Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe
 115 120 125
 Gly Phe Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His
 130 135 140
 Gly Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Gly Leu Gln Pro Gly Ala
 165 170 175
 Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro Arg Tyr
 180 185 190
 Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu Lys Val Pro
 195 200 205
 Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ala Ala Pro
 210 215 220
 Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe Phe Ser Gln Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr Trp Ser Val Leu Cys Cys
 245 250 255
 Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr Tyr Leu Val Asp Met Gln Arg
 260 265 270
 Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr
 275 280 285
 Met Val Ser Val Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val
 290 295 300
 Val Cys Asn Glu Arg Phe Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Val Gln
 305 310 315 320
 Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe
 325 330 335
 Phe Ser Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp
 340 345 350
 Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn
 355 360 365
 Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr
 10

BL62513PC.ST25.txt
380

370

375

Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly
 385 390 395 400
 Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Ser Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe Val
 405 410 415
 Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu
 420 425 430
 Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp
 435 440 445
 Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu Glu Arg Leu Met Val Arg Ile Gly Val
 450 455 460
 Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile Val Ile Ala Cys Tyr
 465 470 475 480
 Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp Glu Arg Ser Trp Val Ser
 485 490 495
 Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro
 500 505 510
 Arg Met Ser Pro Asp Phe Thr Val Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr
 515 520 525
 Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr
 530 535 540
 Leu His Ser Trp Arg Lys Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His
 545 550 555 560
 Gly Glu Thr Thr Val
 565

<210> 5

<211> 666

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (666)

<223> Rezeptor "Frizzled" FZD 3

BL62513PC.ST25.txt

<400> 5

Met Ala Met Thr Trp Ile Val Phe Ser Leu Trp Pro Leu Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Met Gly His Ile Gly Gly His Ser Leu Phe Ser Cys Glu Pro Ile Thr
 20 25 30
 Leu Arg Met Cys Gln Asp Leu Pro Tyr Asn Thr Thr Phe Met Pro Asn
 35 40 45
 Leu Leu Asn His Tyr Asp Gln Gln Thr Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro
 50 55 60
 Phe His Pro Met Val Asn Leu Asp Cys Ser Arg Asp Phe Arg Pro Phe
 65 70 75 80
 Leu Cys Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Cys Met Glu Tyr Gly Arg Val Thr
 85 90 95
 Leu Pro Cys Arg Arg Leu Cys Gln Arg Ala Tyr Ser Glu Cys Ser Lys
 100 105 110
 Leu Met Glu Met Phe Gly Val Pro Trp Pro Glu Asp Met Glu Cys Ser
 115 120 125
 Arg Phe Pro Asp Cys Asp Glu Pro Tyr Pro Arg Leu Val Asp Leu Asn
 130 135 140
 Leu Ala Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Arg Asp
 145 150 155 160
 Tyr Gly Phe Trp Cys Pro Arg Glu Leu Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu His Val Arg Asp Cys Ser Pro Pro Cys Pro Asn Met
 180 185 190
 Tyr Phe Arg Arg Glu Glu Leu Ser Phe Ala Arg Tyr Phe Ile Gly Leu
 195 200 205
 Ile Ser Ile Ile Cys Leu Ser Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe
 210 215 220
 Leu Ile Asp Val Thr Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe
 225 230 235 240
 Tyr Ala Val Cys Tyr Met Met Val Ser Leu Ile Phe Phe Ile Gly Phe
 245 250 255

BL62513PC.ST25.txt

Leu Leu Glu Asp Arg Val Ala Cys Asn Ala Ser Ile Pro Ala Gln Tyr
 260 265 270
 Lys Ala Ser Thr Val Thr Gln Gly Ser His Asn Lys Ala Cys Thr Met
 275 280 285
 Leu Phe Met Ile Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Ser Val Trp Trp
 290 295 300
 Val Ile Leu Thr Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Val Pro Lys Trp Gly
 305 310 315 320
 Ser Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ala Leu Leu Phe His Ala Ser Ala Trp
 325 330 335
 Gly Ile Pro Gly Thr Leu Thr Ile Ile Leu Leu Ala Met Asn Lys Ile
 340 345 350
 Glu Gly Asp Asn Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Val
 355 360 365
 Asp Ala Leu Arg Tyr Phe Val Leu Ala Pro Leu Cys Leu Tyr Val Val
 370 375 380
 Val Gly Val Ser Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn Arg Val
 385 390 395 400
 Arg Ile Glu Ile Pro Leu Glu Lys Glu Asn Gln Asp Lys Leu Val Lys
 405 410 415
 Phe Met Ile Arg Ile Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Leu Val Pro Leu
 420 425 430
 Leu Val Val Ile Gly Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Tyr Arg Gly Ile
 435 440 445
 Trp Glu Thr Thr Trp Ile Gln Glu Arg Cys Arg Glu Tyr His Ile Pro
 450 455 460
 Cys Pro Tyr Gln Val Thr Gln Met Ser Arg Pro Asp Leu Ile Leu Phe
 465 470 475 480
 Leu Met Lys Tyr Leu Met Ala Leu Ile Val Gly Ile Pro Ser Val Phe
 485 490 495
 Trp Val Gly Ser Lys Lys Thr Cys Phe Glu Trp Ala Ser Phe Phe His
 500 505 510
 Gly Arg Arg Lys Lys Glu Ile Val Asn Glu Ser Arg Gln Val Leu Gln
 515 520 525

BL62513PC.ST25.txt

Glu Pro Asp Phe Ala Gln Ser Leu Leu Arg Asp Pro Asn Thr Pro Ile
 530 535 540

Ile Arg Lys Ser Arg Gly Thr Ser Thr Gln Gly Thr Ser Thr His Ala
 545 550 555 560

Ser Ser Thr Gln Leu Ala Met Val Asp Asp Gln Arg Ser Lys Ala Gly
 565 570 575

Ser Ile His Ser Lys Val Ser Ser Tyr His Gly Ser Leu His Arg Ser
 580 585 590

Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Pro Cys Ser Tyr Arg Gly Met Glu Glu Arg
 595 600 605

Leu Pro His Gly Ser Met Ser Arg Leu Thr Asp His Ser Arg His Ser
 610 615 620

Ser Ser His Arg Leu Asn Glu Gln Ser Arg His Ser Ser Ile Arg Asp
 625 630 635 640

Leu Ser Asn Asn Pro Met Thr His Ile Thr His Gly Thr Ser Met Asn
 645 650 655

Arg Val Ile Glu Glu Asp Gly Thr Ser Ala
 660 665

<210> 6

<211> 537

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(537)

<223> Receptor "Frizzled" FZD 4

<400> 6

Met Ala Trp Arg Gly Ala Gly Pro Ser Val Pro Gly Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Val Gly Leu Ser Leu Gly Leu Leu Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly
 20 25 30

Pro Ala Arg Gly Phe Gly Asp Glu Glu Glu Arg Arg Cys Asp Pro Ile

BL62513PC.ST25.txt

35

40

45

Arg Ile Ser Met Cys Gln Asn Leu Gly Tyr Asn Val Thr Lys Met Pro
 50 55 60

Asn Leu Val Gly His Glu Leu Gln Thr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Thr
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Pro Leu Ile Gln Tyr Gly Cys Ser Ser Gln Leu Gln Phe
 85 90 95

Phe Leu Cys Ser Val Tyr Val Pro Met Cys Thr Glu Lys Ile Asn Ile
 100 105 110

Pro Ile Gly Pro Cys Gly Gly Met Cys Leu Ser Val Lys Arg Arg Cys
 115 120 125

Glu Pro Val Leu Lys Glu Phe Gly Phe Ala Trp Pro Glu Ser Leu Asn
 130 135 140

Cys Ser Lys Phe Pro Pro Gln Asn Asp His Asn His Met Cys Met Glu
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Asp Glu Glu Val Pro Leu Pro His Lys Thr Pro Ile Gln
 165 170 175

Pro Gly Glu Glu Cys His Ser Val Gly Thr Asn Ser Asp Gln Tyr Ile
 180 185 190

Trp Val Lys Arg Ser Leu Asn Cys Val Leu Lys Cys Gly Tyr Asp Ala
 195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Ala Lys Glu Phe Thr Asp Ile Trp Met Ala
 210 215 220

Val Trp Ala Ser Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr
 225 230 235 240

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile
 245 250 255

Phe Leu Ser Met Cys Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile Ala Tyr Ile Val Arg
 260 265 270

Leu Thr Val Gly Arg Glu Arg Ile Ser Cys Asp Phe Glu Glu Ala Ala
 275 280 285

Glu Pro Val Leu Ile Gln Glu Gly Leu Lys Asn Thr Gly Cys Ala Ile
 290 295 300

Ile Phe Leu Leu Met Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp

BL62513PC.ST25.txt
315

305

310

320

Val Ile Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Leu Lys Trp Gly
325 330 335

His Glu Ala Ile Glu Met His Ser Ser Tyr Phe His Ile Ala Ala Trp
340 345 350

Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Val Ile Leu Ile Met Arg Leu Val
355 360 365

Asp Ala Asp Glu Leu Thr Gly Leu Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu
370 375 380

Asp Ala Leu Thr Gly Phe Val Val Ala Pro Leu Phe Thr Tyr Leu Val
385 390 395 400

Ile Gly Thr Leu Phe Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Leu Phe Lys Ile
405 410 415

Arg Ser Asn Leu Gln Lys Asp Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Arg
420 425 430

Leu Met Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
435 440 445

Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Ile Ser Asn Trp Ala Leu
450 455 460

Phe Arg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Asn Met Ala Val Glu Met Leu Lys
465 470 475 480

Thr Phe Met Ser Leu Leu Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp
485 490 495

Ser Ala Lys Ser Leu His Thr Trp Gln Lys Cys Ser Asn Arg Leu Val
500 505 510

Asn Ser Gly Lys Val Lys Arg Glu Lys Arg Gly Asn Gly Trp Val Lys
515 520 525

Pro Gly Lys Gly Ser Glu Thr Val Val
530 535

<210> 7

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

BL62513PC.ST25.txt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(585)

<223> Receptor "Frizzled" FZD 5

<400> 7

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ser Lys Ala Pro Val
 20 25 30

Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly Tyr Asn Leu
 35 40 45

Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly
 50 55 60

Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Thr Met Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Pro
 85 90 95

Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala
 100 105 110

Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro
 115 120 125

Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu
 130 135 140

Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Phe Pro Ala Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro
 165 170 175

Ala Ser Gly Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys
 180 185 190

Arg Glu Pro Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn
 195 200 205

Lys Val Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln
 210 215 220

BL62513PC.ST25.txt

Pro Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly
 225 230 235 240
 Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala Thr
 245 250 255
 Phe Leu Ile Asp Met Asp Thr Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile
 260 265 270
 Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg
 275 280 285
 Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg Glu His Asn His
 290 295 300
 Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Ile Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu
 325 330 335
 Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Ala Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala
 340 345 350
 Ile Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro
 355 360 365
 Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu
 385 390 395 400
 Arg Arg Phe Val Leu Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr
 405 410 415
 Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val
 420 425 430
 Ile Lys Gln Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile
 435 440 445
 Arg Ile Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val
 450 455 460
 Val Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala
 465 470 475 480
 Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg Ala
 485 490 495

BL62513PC.ST25.txt

Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys Leu Val
 500 505 510

Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu
 515 520 525

Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg Pro Arg Arg Gly
 530 535 540

His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp Tyr Pro Glu Ala Ser
 545 550 555 560

Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Ala Thr Tyr
 565 570 575

His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val
 580 585

<210> 8

<211> 706

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_features

<222> (1)..(706)

<223> Receptor "Frizzled" FZD 6

<400> 8

Met Glu Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Cys Ile Phe Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Gly His Ser Leu Phe Thr Cys Glu Pro Ile Thr Val Pro Arg Cys
 20 25 30

Met Lys Met Ala Tyr Asn Met Thr Phe Phe Pro Asn Leu Met Gly His
 35 40 45

Tyr Asp Gln Ser Ile Ala Ala Val Glu Met Glu His Phe Leu Pro Leu
 50 55 60

Ala Asn Leu Glu Cys Ser Pro Asn Ile Glu Thr Phe Leu Cys Lys Ala
 65 70 75 80

Phe Val Pro Thr Cys Ile Glu Gln Ile His Val Val Pro Pro Cys Arg
 19

BL62513PC.ST25.txt
90

85

95

Lys Leu Cys Glu Lys Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Leu Ile Asp Thr
 100 105 110
 Phe Gly Ile Arg Trp Pro Glu Glu Leu Glu Cys Asp Arg Leu Gln Tyr
 115 120 125
 Cys Asp Glu Thr Val Pro Val Thr Phe Asp Pro His Thr Glu Phe Leu
 130 135 140
 Gly Pro Gln Lys Lys Thr Glu Gln Val Gln Arg Asp Ile Gly Phe Trp
 145 150 155 160
 Cys Pro Arg His Leu Lys Thr Ser Gly Gly Gln Gly Tyr Lys Phe Leu
 165 170 175
 Gly Ile Asp Gln Cys Ala Pro Pro Cys Pro Asn Met Tyr Phe Lys Ser
 180 185 190
 Asp Glu Leu Glu Phe Ala Lys Ser Phe Ile Gly Thr Val Ser Ile Phe
 195 200 205
 Cys Leu Cys Ala Thr Leu Phe Thr Phe Leu Thr Phe Leu Ile Asp Val
 210 215 220
 Arg Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Ser Val Cys
 225 230 235 240
 Tyr Ser Ile Val Ser Leu Met Tyr Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Asp
 245 250 255
 Ser Thr Ala Cys Asn Lys Ala Asp Glu Lys Leu Glu Leu Gly Asp Thr
 260 265 270
 Val Val Leu Gly Ser Gln Asn Lys Ala Cys Thr Val Leu Phe Met Leu
 275 280 285
 Leu Tyr Phe Phe Thr Met Ala Gly Thr Val Trp Trp Val Ile Leu Thr
 290 295 300
 Ile Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Arg Lys Trp Ser Cys Glu Ala Ile
 305 310 315 320
 Glu Gln Lys Ala Val Trp Phe His Ala Val Ala Trp Gly Thr Pro Gly
 325 330 335
 Phe Leu Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Asn Lys Val Glu Gly Asp Asn
 340 345 350
 Ile Ser Gly Val Cys Phe Val Gly Leu Tyr Asp Leu Asp Ala Ser Arg
 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400

BL62513PC.ST25.txt

355

360

365

Tyr Phe Val Leu Leu Pro Leu Cys Leu Cys Val Phe Val Gly Leu Ser
 370 375 380

Leu Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Leu Asn His Val Arg Gln Val Ile
 385 390 395 400

Gln His Asp Gly Arg Asn Gln Glu Lys Leu Lys Lys Phe Met Ile Arg
 405 410 415

Ile Gly Val Phe Ser Gly Leu Tyr Leu Val Pro Leu Val Thr Leu Leu
 420 425 430

Gly Cys Tyr Val Tyr Glu Gln Val Asn Arg Ile Thr Trp Glu Ile Thr
 435 440 445

Trp Val Ser Asp His Cys Arg Gln Tyr His Ile Pro Cys Pro Tyr Gln
 450 455 460

Ala Lys Ala Lys Ala Arg Pro Glu Leu Ala Leu Phe Met Ile Lys Tyr
 465 470 475 480

Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Ser Ala Val Phe Trp Val Gly Ser
 485 490 495

Lys Lys Thr Cys Thr Glu Trp Ala Gly Phe Phe Lys Arg Asn Arg Lys
 500 505 510

Arg Asp Pro Ile Ser Glu Ser Arg Arg Val Leu Gln Glu Ser Cys Glu
 515 520 525

Phe Phe Leu Lys His Asn Ser Lys Val Lys His Lys Lys Lys His Tyr
 530 535 540

Lys Pro Ser Ser His Lys Leu Lys Val Ile Ser Lys Ser Met Gly Thr
 545 550 555 560

ser Thr Gly Ala Thr Ala Asn His Gly Thr Ser Ala Val Ala Ile Thr
 565 570 575

Ser His Asp Tyr Leu Gly Gln Glu Thr Leu Thr Glu Ile Gln Thr Ser
 580 585 590

Pro Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Lys Ala Asp Gly Ala Ser Thr Pro
 595 600 605

Arg Leu Arg Glu Gln Asp Cys Gly Glu Pro Ala Ser Pro Ala Ala Ser
 610 615 620

Ile Ser Arg Leu Ser Gly Glu Gln Val Asp Gly Lys Gly Gln Ala Gly

BL62513PC.ST25.txt

625

630

635

640

Ser Val Ser Glu Ser Ala Arg Ser Glu Gly Arg Ile Ser Pro Lys Ser
 645 650 655

Asp Ile Thr Asp Thr Gly Leu Ala Gln Ser Asn Asn Leu Gln Val Pro
 660 665 670

Ser Ser Ser Glu Pro Ser Ser Leu Lys Gly Ser Thr Ser Leu Leu Val
 675 680 685

His Pro Val Ser Gly Val Arg Lys Glu Gln Gly Gly Gly Cys His Ser
 690 695 700

Asp Thr
 705

<210> 9

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_features

<222> (1)..(574)

<223> Rezeptor "Frizzled" FZD 7

<400> 9

Met Arg Asp Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ser Leu Gly Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Ala Gly Ala
 20 25 30

Gln Pro Tyr His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Val Pro Asp His Gly Phe
 35 40 45

Cys Gln Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln
 50 55 60

Thr Ile Leu Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly
 65 70 75 80

Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser Pro
 85 90 95

BL62513PC.ST25.txt

Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys Thr Val
 100 105 110
 Leu Asp Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Leu Cys Glu Arg Ala Arg
 115 120 125
 Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe Gln Trp Pro Glu
 130 135 140
 Arg Leu Arg Cys Glu Asn Phe Pro Val His Gly Ala Gly Glu Ile Cys
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Asn Thr Ser Asp Gly Ser Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro
 165 170 175
 Thr Ala Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Leu Pro Asp Leu Pro Phe Thr Ala
 180 185 190
 Leu Pro Pro Gly Ala Ser Asp Gly Arg Gly Arg Pro Ala Phe Pro Phe
 195 200 205
 Ser Cys Pro Arg Gln Leu Lys Val Pro Pro Tyr Leu Gly Tyr Arg Phe
 210 215 220
 Leu Gly Glu Arg Asp Cys Gly Ala Pro Cys Glu Pro Gly Arg Ala Asn
 225 230 235 240
 Gly Leu Met Tyr Phe Lys Glu Glu Glu Arg Arg Phe Ala Arg Leu Trp
 245 250 255
 Val Gly Val Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Leu Phe Thr Val
 260 265 270
 Leu Thr Tyr Leu Val Asp Met Arg Arg Phe Ser Tyr Pro Glu Arg Pro
 275 280 285
 Ile Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Phe Met Val Ala Val Ala His Val
 290 295 300
 Ala Gly Phe Leu Leu Glu Asp Arg Ala Val Cys Val Glu Arg Phe Ser
 305 310 315 320
 Asp Asp Gly Tyr Arg Thr Val Ala Gln Gly Thr Lys Lys Glu Gly Cys
 325 330 335
 Thr Ile Leu Phe Met Val Leu Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile
 340 345 350
 Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys
 355 360 365

BL62513PC.ST25.txt

Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala
 370 375 380
 Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile Thr Ile Leu Ala Met Gly
 385 390 395 400
 Gln Val Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly Val Cys Tyr Val Gly Leu Ser
 405 410 415
 Ser Val Asp Ala Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr
 420 425 430
 Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe
 435 440 445
 Arg Ile Arg Thr Ile Met Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Lys Leu
 450 455 460
 Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Ala Thr Ile Val Leu Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg
 485 490 495
 Glu His Trp Glu Arg Thr Trp Leu Leu Gln Thr Cys Lys Ser Tyr Ala
 500 505 510
 Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Pro Pro Met Ser Pro Asp Phe Thr
 515 520 525
 Val Phe Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Met Ile Val Gly Ile Thr Thr
 530 535 540
 Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu Gln Ser Trp Arg Arg Phe
 545 550 555 560
 Tyr His Arg Leu Ser His Ser Ser Lys Gly Glu Thr Ala Val
 565 570

<210> 10

<211> 694

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_features

<222> (1)..(694)

BL62513PC.ST25.txt

<223> Receptor "Frizzled" FZD 8

<400> 10

Met Glu Trp Gly Tyr Leu Leu Glu Val Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Gln Arg Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ala Lys Glu
 20 25 30

Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys Lys Gly Ile Gly Tyr
 35 40 45

Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln Asp Glu
 50 55 60

Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu Ile Gln Cys
 65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Thr Pro Ile Cys
 85 90 95

Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg Ser Val Cys Glu
 100 105 110

Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg Gln Tyr Gly Phe Ala
 115 120 125

Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro Glu Gln Gly Asn Pro
 130 135 140

Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Thr Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Pro Pro Pro Gly Glu Gln Pro
 165 170 175

Pro Ser Gly Ser Gly His Gly Arg Pro Gly Ala Arg Pro Pro His
 180 185 190

Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala Ala Ala Pro Pro
 195 200 205

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Pro Gly Gly Gly
 210 215 220

Ala Ala Pro Cys Glu Pro Gly Cys Gln Cys Arg Ala Pro Met Val Ser
 225 230 235 240

Val Ser Ser Glu Arg His Pro Leu Tyr Asn Arg Val Lys Thr Gly Gln
 25

BL62513PC.ST25.txt
250

245

255

Ile Ala Asn Cys Ala Leu Pro Cys His Asn Pro Phe Phe Ser Gln Asp
 260 265 270
 Glu Arg Ala Phe Thr Val Phe Trp Ile Gly Leu Trp Ser Val Leu Cys
 275 280 285
 Phe Val Ser Thr Phe Ala Thr Val Ser Thr Phe Leu Ile Asp Met Glu
 290 295 300
 Arg Phe Lys Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr
 305 310 315 320
 Leu Phe Val Ser Val Gly Tyr Leu Val Arg Leu Val Ala Gly His Glu
 325 330 335
 Lys Val Ala Cys Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly
 340 345 350
 Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 355 360 365
 Gly Pro Gly Gly Arg Gly Glu Tyr Glu Glu Leu Gly Ala Val Glu Gln
 370 375 380
 His Val Arg Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys Thr Val Val Phe
 385 390 395 400
 Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile
 405 410 415
 Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Met Lys Trp Gly Asn Glu
 420 425 430
 Ala Ile Ala Gly Tyr Ser Gln Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Leu Val
 435 440 445
 Pro Ser Val Lys Ser Ile Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly
 450 455 460
 Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys Tyr Val Gly Asn Gln Ser Leu Asp Asn
 465 470 475 480
 Leu Arg Gly Phe Val Leu Ala Pro Leu Val Ile Tyr Leu Phe Ile Gly
 485 490 495
 Thr Met Phe Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser
 500 505 510
 Val Ile Lys Gln Gln Asp Gly Pro Thr Lys Thr His Lys Leu Glu Lys

BL62513PC.ST25.txt

515

520

525

Leu Met Ile Arg Leu Gly Leu Phe Thr Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala
 530 535 540
 Ala Val Val Val Ala Cys Leu Phe Tyr Glu Gln His Asn Arg Pro Arg
 545 550 555 560
 Trp Glu Ala Thr His Asn Cys Pro Cys Leu Arg Asp Leu Gln Pro Asp
 565 570 575
 Gln Ala Arg Arg Pro Asp Tyr Ala Val Phe Met Leu Lys Tyr Phe Met
 580 585 590
 Cys Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Ser Gly Lys
 595 600 605
 Thr Leu Glu Ser Trp Arg Ser Leu Cys Thr Arg Cys Cys Trp Ala Ser
 610 615 620
 Lys Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly
 645 650 655
 Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Tyr Ser Asp Val Ser Thr Gly
 660 665 670
 Leu Thr Trp Arg Ser Gly Thr Ala Ser Ser Val Ser Tyr Pro Lys Gln
 675 680 685
 Met Pro Leu Ser Gln Val
 690

<210> 11

<211> 591

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_features

<222> (1)..(591)

<223> Rezeptor "Frizzled" FZD 9

<400> 11

BL62513PC.ST25.txt

Met Ala Val Ala Pro Leu Arg Gly Ala Leu Leu Leu Trp Gln Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Gly Ala Ala Leu Glu Ile Gly Arg Phe Asp Pro Glu Arg
 20 25 30
 Gly Arg Gly Ala Ala Pro Cys Gln Ala Val Glu Ile Pro Met Cys Arg
 35 40 45
 Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr Arg Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr
 50 55 60
 Ser Gln Gly Glu Ala Ala Ala Glu Leu Ala Glu Phe Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Gln Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr
 85 90 95
 Ala Pro Met Cys Thr Asp Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg
 100 105 110
 Pro Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Arg Cys Ala Pro Ile Met Glu Gln
 115 120 125
 Phe Asn Phe Gly Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ala Arg Leu Pro Thr
 130 135 140
 Arg Asn Asp Pro His Ala Leu Cys Met Glu Ala Pro Glu Asn Ala Thr
 145 150 155 160
 Ala Gly Pro Ala Glu Pro His Lys Gly Leu Gly Met Leu Pro Val Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Ala Arg Pro Pro Gly Asp Leu Gly Pro Gly Ala Gly Gly
 180 185 190
 Ser Gly Thr Cys Glu Asn Pro Glu Lys Phe Gln Tyr Val Glu Lys Ser
 195 200 205
 Arg Ser Cys Ala Pro Arg Cys Gly Pro Gly Val Glu Val Phe Trp Ser
 210 215 220
 Arg Arg Asp Lys Asp Phe Ala Leu Val Trp Met Ala Val Trp Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Cys Phe Phe Ser Thr Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Leu Glu
 245 250 255
 Pro His Arg Phe Gln Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met
 260 265 270

BL62513PC.ST25.txt

Cys Tyr Asn Val Tyr Ser Leu Ala Phe Leu Ile Arg Ala Val Ala Gly
 275 280 285
 Ala Gln Ser Val Ala Cys Asp Gln Glu Ala Gly Ala Leu Tyr Val Ile
 290 295 300
 Gln Glu Gly Leu Glu Asn Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Leu Leu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Phe Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu
 325 330 335
 Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu
 340 345 350
 Ala His Gly Ser Tyr Phe His Met Ala Ala Trp Gly Leu Pro Ala Leu
 355 360 365
 Lys Thr Ile Val Ile Leu Thr Leu Arg Lys Val Ala Gly Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Gly Leu Cys Tyr Val Ala Ser Thr Asp Ala Ala Ala Leu Thr Gly
 385 390 395 400
 Phe Val Leu Val Pro Leu Ser Gly Tyr Leu Val Leu Gly Ser Ser Phe
 405 410 415
 Leu Leu Thr Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Lys Ile Met Lys
 420 425 430
 Thr Gly Gly Thr Asn Thr Glu Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Lys Ile
 435 440 445
 Gly Val Phe Ser Ile Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Val
 450 455 460
 Cys Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Phe Trp Arg Leu Arg Ala
 465 470 475 480
 Thr Glu Gln Pro Cys Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gly Arg Arg Asp
 485 490 495
 Cys Ser Leu Pro Gly Gly Ser Val Pro Thr Val Ala Val Phe Met Leu
 500 505 510
 Lys Ile Phe Met Ser Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val
 515 520 525
 Trp Ser Ser Lys Thr Phe Gln Thr Trp Gln Ser Leu Cys Tyr Arg Lys
 530 535 540

BL62513PC.ST25.txt

Ile Ala Ala Gly Arg Ala Arg Ala Lys Ala Cys Arg Ala Pro Gly Ser
 545 550 555 560

Tyr Gly Arg Gly Thr His Cys His Tyr Lys Ala Pro Thr Val Val Leu
 565 570 575

His Met Thr Lys Thr Asp Pro Ser Leu Glu Asn Pro Thr His Leu
 580 585 590

<210> 12

<211> 581

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_features

<222> (1)..(581)

<223> Rezeptor "Frizzled" FZD 10

<400> 12

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
 1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
 20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
 35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
 50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
 65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
 85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
 100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
 115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
 130

BL62513PC.ST25.txt
140

130

135

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg
145 150 155 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser
165 170 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys
180 185 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala
195 200 205

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys
210 215 220

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe
225 230 235 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe
245 250 255

Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val
260 265 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile
275 280 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu
290 295 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly
305 310 315 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu
325 330 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser
340 345 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu
355 360 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys
370 375 380

Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile
385 390 395 400

Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly

BL62513PC.ST25.txt
410

405

415

Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu
 420 425 430
 Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser
 435 440 445
 Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr
 450 455 460
 Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys
 465 470 475 480
 Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala
 485 490 495
 Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu
 500 505 510
 Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu
 515 520 525
 Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg
 530 535 540
 Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln
 565 570 575
 Ser Pro Thr Cys Val
 580

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.